蟬花保護腎功能之研究

陳勁初[1*]、鄭劍廷[2]

[1]葡萄王生技股份有限公司

[2]台大醫學院臨床醫學研究所

[*]通訊作者電子信箱：gkbioeng@grapeking.com.tw

摘要

蟬花爲傳統中藥材，是由蟲草屬(Cordyceps)眞菌*C. cicadae*、*C. sobolifera*或*C. cicadicola*等眞菌感染蟬科昆蟲幼蟲後所形成的蟲生眞菌複合體。最早見於魏晉南北朝時期，使用歷史遠久於冬蟲夏草。本研究使用蟬花菌發酵液之水萃取物，以體外及體內試驗探討脂多糖引發腎臟細胞之傷害。實驗結果顯示以蟬花菌絲體水萃物餵食以LPS (Lipopolysaccharide；E. coli O127:B8)及gentamycin引發腎損傷之大鼠，發現蟬花菌絲體水萃物具有減緩LPS刺激後之大鼠腎臟細胞傷害，能有效改善大鼠之腎血流量(Renal blood flow；RBF)及腎絲球過濾率(Glomerular filtration rate；GFR)；對於預防gentamycin所引起之腎傷害方面，先餵食蟬花菌之大鼠，其血尿中的尿素氮及血清肌酸酐、微白蛋白(microalbumin) 及 NAG(N-Acetyl-β-D-glucosaminidase)等指標值較不易上升。以蟬花菌醱酵液餵食對STZ (Streptozotocin)誘發糖尿病腎臟損傷之大鼠的保護作用之研究，發現蟬花醱酵液可以明顯的降低血糖及抑制STZ引起的TGF-β (transforming growth factor-β)蛋白過度表現之現象，腎臟中的TGF-β表現過量易增加腎臟傷害。該結果顯示蟬花菌醱酵液對於腎臟組織有保護功效及延緩傷害的功效。

關鍵詞：蟬花、LPS、gentamycin、Cordyceps

緒 言

蟬花又名土蟬花、蟲花、蟬草、蟬茸和胡蟬等，是由蟲草屬(*Cordyceps*)眞菌 *C. cicadae C. sobolifera*或*C. cicadicola*等眞菌感染蟬科山蟬(*Cicada flammate*)、蟪蛄(*Platypleura kaempferi*)、黑蚱(*Crytotympana pustulata*)及竹蟬(*Platylomia pieli*)等幼蟲，後於蟲體頭部形成花蕾狀子座，故名蟬花。藥用部位爲其子座及寄主昆蟲的屍體(菌核)。中國學者王等人將蟬花依不同的寄主及感染菌種分類爲大蟬花或金蟬草*C. cicadae*、小蟬花*C. sobolifera*及蟬草或蟬生蟲草*C. cicadicola*三種，並認爲大蟬花才是眞正的蟬花，但日本學者水野卓(1992)及中國學者陳以平等人研究蟬花子實體所使用或發表者皆爲小蟬花(*C. sobolifera*)。蟬花多產於長江以南熱帶和亞熱帶地區，在中國爲福建、浙江、四川、雲南、江蘇等地。我國亦有農民曾在花蓮光復鄉掘獲野生子實體(Fig1.)。

蟬花之名最早見於南北朝劉宋時代之”雷公炮製論”中記載：凡使蟬花要白花全者。收得後於屋下懸乾，去甲土後用漿水煮一日，至夜焙乾，研細用之。野生蟬花之歷史記載比冬蟲夏草早了800年。蟬花入藥已有一千多年的歷史，根據宋朝蘇頌的傳統醫書《圖經本草》記載“山蜀中，其蟬頭上有一角，如花冠狀，謂之蟬花。另據北宋唐愼微所著《証類本草》記載 ”蟬花味甘、性寒、無毒，具疏散風熱、定驚解痙之效，主治小兒夜啼、心悸等症狀。《本草綱目》亦記載”蟬花功同蟬蛻，又止瘧疾”。傳統常用方劑如「萬應蟬花散」、「蟬花明目方」及「蟬花清熱方」等，在《中華藥物大全》和《中華藥海》兩部中藥典籍中均有記載。在日本，亦早於1612年即初見蟬花之名於「多識篇」及小野蘭山的「本草綱目啓蒙」(1803)等文獻。至於學名*Isaria cicadae*爲1838年Miquel 所定，其後出現多種同物異名如*Cordyceps cicadae Isaria basili sphaeria sinclairii*等，Rant (1925)亦提到” Sandwhe” (台語發音)爲治療小兒的藥物。

全球第一個金蟬花基因組框架圖譜研究成果於2011年國際生物醫藥與生物技術論壇上發表，上，該研究發現，金蟬花基因組是人類基因組大小的八十分之一，其中含有約1.6萬個候選基因，接近人類基因數量的二分之一，其發生變異的基因不到1 %，遠低於冬蟲夏草10%的變異率，該結果顯示出金蟬花遺傳結構穩定性良好，菌種變異性低，有利於分子生物的進階研究。

經藥理研究證實天然蟬花子實體與冬蟲夏草成份相近，而近年來許多的

動物及臨床實驗研究發現，蟬花能有助於減輕各項慢性腎臟疾病之功效。以蟬花子實體進臨床實驗的研究，發現每日飲用蟬花湯有助於改善慢性腎功能衰竭病人之血液及尿液中肌酸酐(Creatinine)清除率、改善血清蛋白含量及減少尿蛋白排出等功效，對早中期慢性腎功能不全患者有一定程度的療效。以固態培養蟬花(*C. sobolifera*)菌絲餵食腎小球硬化之實驗大鼠，其結果顯示餵食固體培養蟬花菌絲體能明顯減少大鼠血清肌酐值(serum creatinine / Scr)、尿素氮上升程度(P＜0.05)，減輕大鼠腎小球硬化程度，有助於延緩大鼠腎小球硬化進程和慢性腎衰竭進展速度。由於固態培養需耗費大量的人力，產品中帶有多量未耗盡的基質，所以我們以液態醱酵大量培養生產蟬花菌絲體做爲天然蟬花的代替品，並進行幾種腎功能損傷保護模式之評估試驗及安全性探討。

二、液態發酵之研究

蟬花菌能利用多種碳源，其中以葡萄糖及蔗糖培養生長最佳；氮源則以酵母萃出物最佳，培養溫度爲24~~26℃，其培養最適 pH約5.0~~6.0之間，以5噸醱酵槽培養約需3-5天即可醱酵完成，生物質量可達2.0 %以上(Fig2.)。經減壓濃縮後冷凍乾燥，可得醱酵全液乾燥品，再經磨粉後即得蟬花菌絲體素材。

三、安全性評估試驗

天然的蟬花子實體毒性低，自中國古代以來已有食用的紀錄。上述醱酵生產的蟬花菌絲體經依衛生署公告已完成第二類安全性評估試驗。在28天餵食毒性試驗方面，以2.0g/kg 之蟬花醱酵菌絲體連續餵食大鼠28天後，經血液及各項病理切片結果顯示，均未對受試動物產生明顯之毒性影響。將蟬花發酵菌絲體添加於離乳仔豬飼料中，進行14天的急毒性及其行爲表現之評估試驗。從實驗結果得知，添加蟬花5%於離乳仔豬之飼料中，連續餵食14天後不會引發仔豬急毒性之現象，對其生長性能表現上並無促進或危害之情形。在基因毒性試驗方面，以2.0g/kg 餵食大鼠其體外染色體毒性試驗及動物體內微核試驗，在染色體異常測試試驗結果得知，蟬花醱酵菌絲體不會使受試小鼠其染色體數目改變及結構變異，也無骨髓抑制作用及對染色體損傷作用之現象，沒有致突變作用。在體外鼷鼠淋巴瘤tk分析法試驗證實蟬花醱酵菌絲體亦沒有明顯細胞毒性，亦不會造成細胞株基因突變。

四、腎損傷保護模式之評估

1.Gentamycin爲臨床上常使用之抗生素，亦早知會引起10-20%使用者腎小管壞死，導致腎衰竭，因此常被使用於探討腎衰竭之模式。文獻中常用劑量爲120 mg/kg大鼠體重，在我們預實驗中發現需160mg/kg大鼠體重才能有明顯傷害指標出現，故試驗時，試驗組先餵食蟬花一周，第二週起以160mg/kg劑量注射並同時飼以蟬花。實驗結果顯示：於誘發腎損傷前先餵食蟬花菌絲體之大鼠(如Fig3.)，經gentamycin誘發腎損傷後，發現其腎損傷程度小於未餵食蟬花或於誘發損傷後開始餵食蟬花之實驗大鼠，其血尿中的尿素氮及血清肌酸酐、微白蛋白(microalbumin) 及NAG(N-Acetyl-β-D-glucosaminidase)等指標值較不易上升。其中無論第三天或第七天發酵液凍乾品皆能有效果，其次做劑量效應分析及產品劃分分析，發現餵食量低至50 mg/kg仍有效果，而且將全液分成菌絲及濾液，發現兩部份皆有效果。

2.LPS (Lipopolysaccharide)所引起之氧化壓力來自於不正常的訊號傳遞、細胞失能、autophagy、apoptosis 及necrosis。其中與caspase有關之細胞凋亡，內質網壓力(ER stress)及與Beclin-1/ LC-3有關之autophagy 已被證實在組織傷害上扮演重要角色。試驗首先以PKI及MDCK兩種分別爲近端及遠端腎小管細胞株進行測試，發現(Fig.5)LPS對兩者之毒殺性皆可因蟬花之添加而減緩，其次在動物試驗時以蟬花菌絲體水萃物餵食以LPS (Lipopolysaccharide ; *E. coli* O127：:B8)引發腎損傷之大鼠，發現蟬花菌絲體水萃物具有減緩經LPS刺激後之大鼠腎臟細胞傷害，能有效改善大鼠之腎血流量(Renal blood flow；RBF)及腎絲球過濾率(Glomerular filtration rate；GFR)。蟬花菌絲體對遠端腎小管細胞株在毒物處理下有較佳的存活率，對Lipopolysaccharide對腎臟的毒害具有保護潛力。且對apoptosis、ER stress及autophagy三方面的傷害一均證明可以改善其個別相關指標蛋白質(Fig 6.)

3.蟬花醱酵萃出物對減緩cyclosporine傷害之研究：cyclosporine為免疫抑制劑，常用於器官移植之病人以避免排斥作用，但亦有腎毒性。以蟬花飼餵375 mg/Kg (300mg水萃物＋75 mg 酒精萃取物)連續兩週後，施以25mg/kg/day連續注射7天，於注射期間持續餵食蟬花萃出物，結果發現因cyclosporine傷害導致之creatinine 及BUN清除率下降，皆可因餵食蟬花萃出物而改善。

4.以蟬花醱酵液對以STZ(streptozotocin)誘發SD大鼠糖尿病腎臟損之保護作用之研究：連續投予餵食蟬花發酵液凍乾品500mg/Kg b.w.12週，與STZ對

Fig1. *C. cicadae* (中國浙江) 及*C. sobolifera* (台灣花蓮)

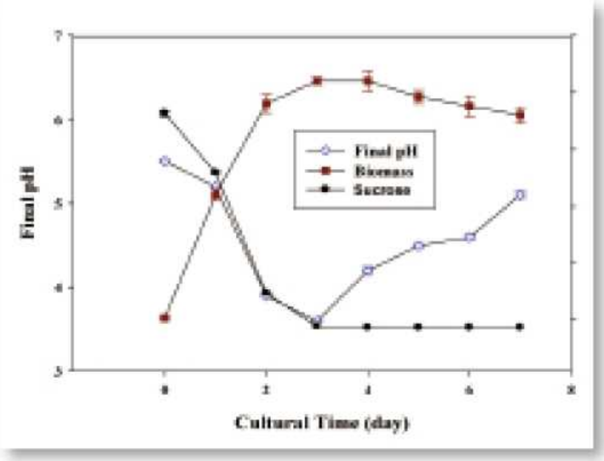

Fig 2.Changes of mycelium biomass, residual sugar concentration and pH in 5T fermentor of *C. sobolifera*.

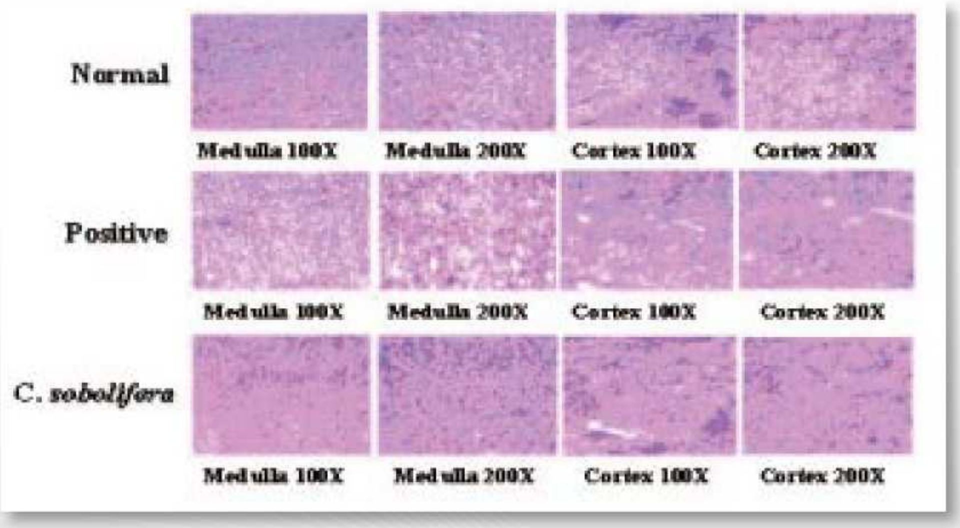

Fig.3. The section showing cortex and medulla of Kidney, H& E stain.

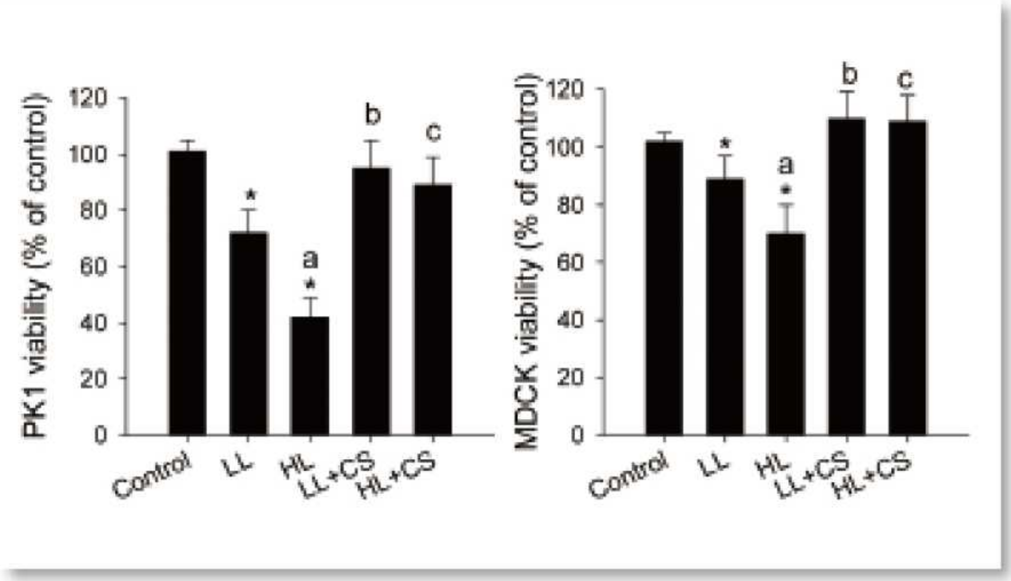

Fig. 4. The effects of Cs extract treatment on PK1 and MDCK cell viability after 24 hours of LPS injury.
LL: low dose of lipopolyasccharide (25 μg/ml); HL: high dose of lipopolysaccharide (250 μg/ml)
LL+CS: low dose of lipopolysaccharide with Cs treatment
HL+Cs: high dose of lipopolysaccharide with Cs treatment

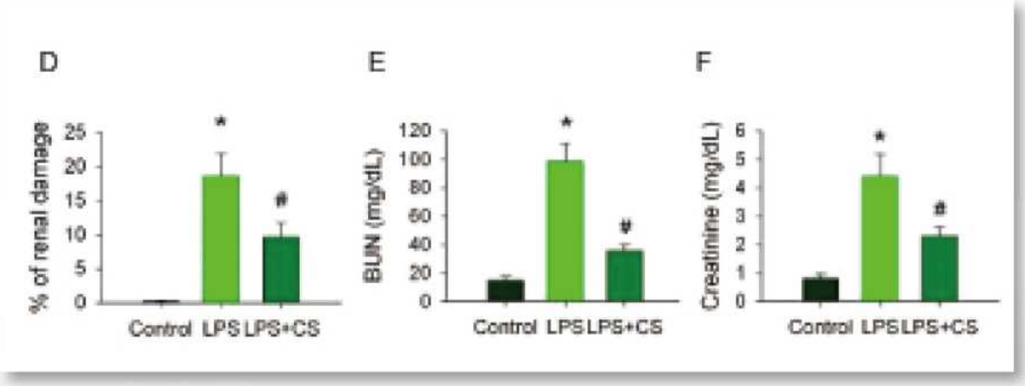

Fig 5. D: Statistical results for semiquantitive analysis of morphologic damage of three groups. Plasma blood urea nitrogen (BUN) (E) and creatinine (F) are displayed. * P<0.05 when compared to control group. # P<0.05 LPS+Cs vs. LPS group.

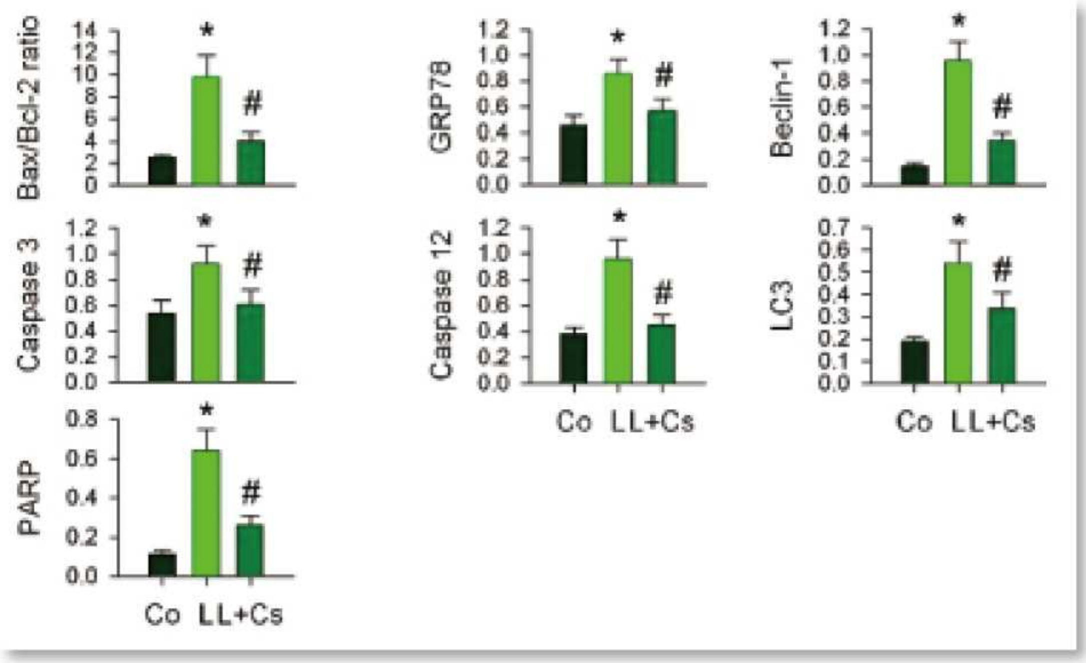

Fig 6. Comparison of apoptosis-related proteins: Bcl-2/Bax ratio, caspase 3 and PARP (A). endoplasmic reticulum stress-related proteins: GRP78 and caspase 12 (B) and autophagy-related proteins: Beclin-1 and LC3 (C) in the control (Co), LPS (L) and LPS+CS (L+C) treated groups.

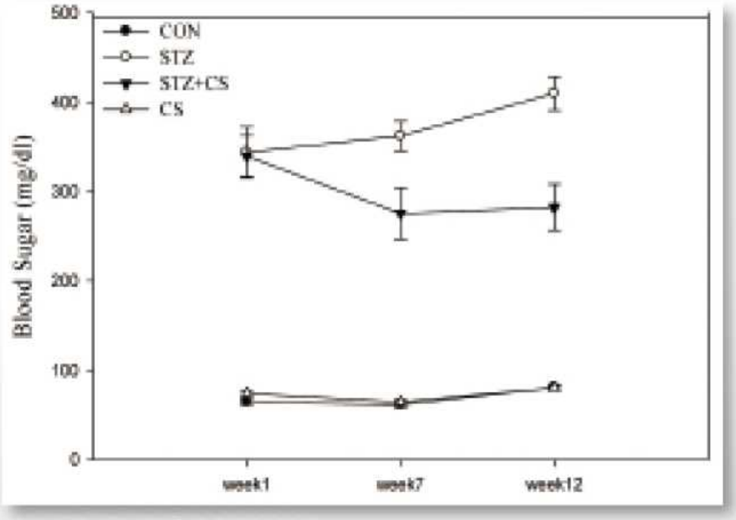

Fig 7. Blood sugar level of rats with different treatments

照組相比，投予蟬花醱酵液之腎組織中之超氧歧化攜(SOD)含量及過氧化氫攜(CAT)蛋白質表現量明顯高於STZ對照組(Fig 5.)，另發現蟬花醱酵液可以明顯的降低血糖(Fig.7)及抑制STZ引起的TGF-β (transforming growth factor-β)蛋白過度表現之現象，經結果得知蟬花菌醱酵液對於腎臟組織有保護功效及延緩傷害之功效，血中BUN 及creatinine 皆有降低，NO則有83% 之減低，IL-6、TNF-α、腎臟MDA、尿中蛋白NF-κB、7GF-β亦皆有下降趨勢，腎臟腫大情形亦獲得改善。

劉等人以天然蟬花子實體水萃濃縮液連續餵食糖尿病小鼠10天，對糖尿病小鼠和正常小鼠之空腹血糖值有顯著降低之作用，對正常小鼠投予50mg/Kg蟬花粗多醣體 6小時後，其血糖值均有顯示差異的下降。以天然蟬花子實體水萃濃縮液連續餵食糖尿病小鼠10天，對糖尿病小鼠和正常小鼠之空腹血糖值有顯著降低之作用。對正常小鼠投予50mg/Kg蟬花粗多醣體 6小時後，其血糖值均有顯示差異的下降。我們以三種劑量(50, 200, 500mg/Kg)之蟬花凍乾品連續餵食正常小鼠兩週後，於空腹時灌食葡萄糖液後，每隔30分鐘分析其血糖值變化，發現餵食組其血糖值皆低於對照組，其劑量愈高血糖值愈低。

結 論

經上述各項實驗結果證實，蟬花醱酵菌絲體可以改善間質腎小管病變，能保護腎小管，改善腎血流動力學蟬花菌在遠端細胞保護效應高，同時會有增生細胞之效果，對於阻塞性腎臟病或慢性腎衰竭之病症，可能有幫助也可能修護受傷之遠端細胞。另外對於受菌血症影響或PAN之腎傷害可能也有幫助。同時蟬花醱酵液具有緩解過高的血糖與腎損傷之指標，對於保護糖尿病腎損傷大鼠有顯著的功效。

Cordyceps sobolifera extract ameliorates nephrotoxicity-induced renal dysfunction in the rat

Chin-Chiu Chen [1,*] Chiang-Ting Chien [2]

[1]Biotechnology center, Grape King Inc., Chung-Li City, Taiwan
[2]Department of Medical research, National Taiwan University Hospital and National Taiwan University College of Medicine, Taipei, Taiwan
[*]Corresponding author: gkbioeng@grapeking.com.tw

Abstract

Cordyceps sobolifera (CS), an economic traditional Chinese herb. may ameliorate nephrotoxicity-induced renal dysfunction in the rat via antioxidant, anti-apoptosis, and anti-autophagy mechanisms. We investigated the water extract of fermented whole broth of CS on lipopolysaccharide (LPS)-induced renal cell injury in vitro and in vivo. We examined CS effect on LPS-induced epithelial Lilly pork kidney (PK1) and Madin-Darby canine kidney epithelial (MDCK) cell death with MTT assay. Two-month CS effects on renal blood flow (RBF), glomerular filtration rate (GFR), plasma blood urea nitrogen and creatinine level and leukocytes (WBC) count were determined in the LPS-treated rats. Cs treatment decrease CsA induced apoptosis through the inhibition of caspase 3 cleaved. When CsA combined with Cs, the CsA-Cs study group had higher expression anti-apoptosis protein of bcl-2 and bax in renal tissue. Our result showed that Cs could ameliorate both renal glomerular function and renal tubule function. In addition, Long-term Cs treatment reduced LPS-induced stress responses and tissue damage possibly via blocking LPS-triggered signaling pathways. We found that Cs blocked the CsA induced apoptosis through the expression of anti-apoptosis factor in renal tubule cells.

Key words: *Cordyceps sobolifera*; Reactive oxygen species; Acute renal failure; Acute renal failure; Lipopolysaccharide